

(19)



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets

(11)

Veröffentlichungsnummer:

**0 362 732
A2**

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(21)

Anmeldenummer: 89118145.5

(51)

Int. Cl. 5: C12N 15/86

(22)

Anmeldetag: 30.09.89

Patentansprüche für folgende Vertragsstaaten:
ES + GR.

(30)

Priorität: 07.10.88 DE 3834157

(43)

Veröffentlichungstag der Anmeldung:
11.04.90 Patentblatt 90/15

(94)

Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE ES FR GB GR IT LI LU NL SE

(71)

Anmelder: **BEHRINGWERKE**
Aktiengesellschaft
Postfach 1140
D-3550 Marburg 1(DE)

(72)

Erfinder: **Fleckenstein, Bernhard, Prof. Dr.**
Schlaifhausen 93
D-8551 Wiesenthau(DE)
Erfinder: **Grassmann, Ralph**
Rennesstrasse 26
D-8520 Erlangen(DE)

(74)

Vertreter: **Klein, Otto, Dr. et al**
Hoechst AG Zentrale Patentabteilung
Postfach 80 03 20
D-6230 Frankfurt am Main 80(DE)

(54)

Selektierbare Vektoren für humane T-Zellen.

(57)

Selektierbare Herpesvirus saimiri Vektoren werden beschrieben, die ein Selektionsgen in einer Verbindungsregion der L- und H-DNA inseriert haben. Solche Vektoren sind in der Lage, humane T-Zellen persistent zu infizieren und damit zur Expression von Fremdgenen in humanen T-Zellen geeignet. Ein zusätzlicher Vorteil besteht darin, daß dabei keine infektiösen Viruspartikel produziert werden.

EP 0 362 732 A2

Selektierbare Vektoren für humane T-Zellen

Die Erfindung betrifft selektierbare Vektoren, die die Expression von Fremdgenen in humanen T-Zellen ermöglichen.

Viren der Herpesgruppe (Herpes Simplex Virus, Cytomegalovirus, Varicella/Zoster Virus oder Herpesvirus suis) konnten erfolgreich eingesetzt werden, um heterologe Gene in lytisch infizierten "Monolayer" Zellkulturen zu exprimieren. Es gibt jedoch keine Zelllinien, die durch diese Viren für längere Zeit persistent infiziert sind. Persistierende Vektoren wurden aus dem Genom von Epstein-Barr Virus (EBV) konstruiert, wobei aber aus den infizierten B-Lymphozyten keine infektiösen, zellfreien Viren erhalten werden konnten.

Es war ebenfalls bekannt, daß Herpesvirus (H.) saimiri sowohl sich lytisch in epitheloiden Zellen vermehrt als auch T-Zellen von Krallenaffen persistent infiziert. Das Genom von H. saimiri besteht aus einer Region von etwa 112 kb einer "unique" DNA niederen GC-Gehalts (L-DNA). Sie ist an beiden Enden von nicht-kodierenden tandemartig angeordneten "Repeat"-Einheiten variabler Zahl (H-DNA) flankiert, die eine Länge von je etwa 1.4 kb besitzen und GC-reich sind. H. saimiri induziert schnell wachsende T-Zell-Lymphome in einigen Primaten der Neuen Welt und kann Krallenaffen-T-Lymphozyten in vitro zu permanentem Wachstum transformieren.

Wir haben gefunden, daß ein rekombinantes H. saimiri Virus, das das neo-Gen enthält, in hoher Zahl durch Geneticin (G418) in Affennierenzelllinien selektiert wird. Die Bedingungen für homologe Rekombination waren so gewählt, daß das neo-Gen, das hier als Beispiel für ein beliebiges selektierbares Gen steht, in die rechte Verbindungsstelle der H- und L-DNA insertiert ist. Diese Rekombinanten sind in der Lage, humane T-Zelllinien persistent zu infizieren, wobei die virale DNA als Episom vorliegt. Da das virale Genom etwa 30% hoch-repetitive DNA enthält, die durch heterologe DNA ersetzbar ist, stehen damit Vektoren zur Expression von Fremdgenen in humanen T-Zellen zur Verfügung.

Ein Vorteil solcher Expressionssysteme ist ferner darin zu sehen, daß persistent infizierte Zellen als "non-producer cells" keine infektiösen Viruspartikel produzieren. Als Ausgangsstämme können auch replikationskompetente, nicht onkogene Varianten von H. saimiri eingesetzt werden. Diese Virusstämme weisen Deletionen in der linksterminalen L-DNA auf (B. Fleckenstein u. R. Desrosiers (1982), "The Herpes viruses, Vol. 1, B. Roizman (ed.), Plenum Publishing Co., New York).

Bisher wurde nicht gezeigt, daß H. saimiri humane lymphatische Zellen infiziert.

Die Erfindung betrifft folglich:

a) Selektierbare H. saimiri Rekombinanten, die ein Selektionsgen in der rechten oder linken Verbindungsstelle bzw. Verbindungsregion der H- und L-DNA insertiert haben,

b) Verfahren zur Herstellung der unter a) genannten Rekombinanten und

c) ihre Verwendung zur Expression von Fremdgenen in humanen T-Lymphozyten, sowie

d) die Erzeugung von Affen T-Zelllinien, die ein Fremdgen konstitutiv exprimieren, mittels transformationskompetenten rekombinanten H. saimiri.

Die Erfindung ist ferner in den Patentansprüchen und den Beispielen weiter ausgeführt.

Beispiel 1: Konstruktion von Plasmid pSneo und pSneoH

pSneo und pSneoH wurden so konstruiert, daß durch die homologe Rekombination mit H. saimiri DNA kein virales Gen deletiert und keine funktionelle Einheit unterbrochen wird.

Das "neo"-Gen kodiert für eine Phosphotransferase, die es ermöglicht, den durch Geneticin (G 418) induzierten Translationsblock in den meisten eukaryotischen Zellen zu umgehen.

Das Plasmid pSV2 neo (P.J. Southern und P. Berg (1982) J. Mol. Appl. Genetics, 327-341, Raven Press, New York) enthält das neo-Gen unter der Transkriptionskontrolle von SV40-Elementen (Früher Promoter/Enhancer, T-Antigen, mRNA Splice-Signal und Polyadenylierungsstellen). Die Transkriptionseinheit "neo" wurde aus pSV2 neo herausgeschnitten und die Restriktionsschnittstellen-Enden nach Standardmethoden von PvuII- in ClaI- bzw. von ECORI- in Sall-Enden umgewandelt. Die Klonierung des KpnI/SmaI Fragments E, das bei etwa 9 kb Länge das rechte Ende der L-DNA ausmacht, ist von KNUST (E. Knust et al. (1983) Gene 25, 281-289) beschrieben.

Der dort verwendete Klonierungsvektor pWD7 mit dem genannten Fragment E - als pWD11 (hier Vektor 3) bezeichnet -, wurde mittels Standardmethoden in den Vektor 5 umgewandelt, dadurch daß die interne Sall-Stelle in pWD7 deletiert und die SmaI-Stelle an der Fragment E/pWD7 Verbindung in eine Sall-Stelle mutiert ist. Die SmaI-bzw. Sall-Schnittstelle ist 35 Nukleotide vom Ende der L-DNA in der ersten H-Repetitionseinheit entfernt. Nach Schneiden von (5) mit Sall und ClaI kann nun das neo-Gen zwischen Fragment E und pWD7 in Vektor (5) zum Plasmid pSneo einligiert werden. Eine H-DNA Repetitionseinheit von 1444 Basenpaaren (bp) wird schließlich nach Spaltung mit TagI zwischen neo und pWD7 Anteil gesetzt, so daß

schließlich Plasmid pSneoH resultiert. Die H-DNA Repetitionseinheit wurde als TaqI-Fragment aus pFG24 erhalten (A.T. Bankier et al. (1985) J. Virol. 55, 133-139). Vorstehend genannte Syntheseschritte sind in Fig. 1 zusammengefaßt.

Beispiel 2: Kotransfektion von linearisierter pSneoH-DNA mit H.saimiri Virion DNA (M-DNA)

0,2 µg bis 0,4 µg über CsCl-Dichtegradienten gereinigte M-DNA (B. Fleckenstein et al. (1975) J. Virol. 15, 398-406) wurde mit 2 µg bis 4 µg durch KpnI linearisierter pSneoH gemischt und in eine Owl Monkey Kidney Zelllinie (OMK - 637, ATCC CRL 1556) nach der Kalziumphosphat-Präzipitationsmethode transfiziert (F.L. Graham und J. van der Eg (1973) J. Virol. 52, 456-467), wobei ein 20% w/v Glycerin-Schock nach 4 Stunden erfolgte. Nach etwa 6 bis 10 Tagen waren erste zytopathische Effekte erkennbar und nach weiteren zwei Wochen waren die Zellen völlig lysiert. Durch die hohe Frequenz an spontaner Rekombination wurden rekombinante H.saimiri in der Regel ohne Selektionsdruck erhalten. Bei geringerer Anzahl von Rekombinanten wird mit Erfolg unter Selektionsdruck nach der Transfektion gearbeitet, wobei die Rekombinanten ausbeute auf bis zu 80% steigt. Restriktionsanalyse mit Sall und Smal in Verbindung mit Southern Blots zeigte, daß etwa zwei Drittel der Virus-Plaques ein vollständiges neo-Gen enthalten. Sechs von 9 Klonen hatten das neo-Gen bzw. pSneoH DNA zwischen die H-DNA Repetitionseinheiten inseriert, zwei Klone hatten die neo-Sequenz in der Verbindungsstelle H/L inseriert. Einer dieser Klone, H.saimiri SIRneoH14 ist in Fig. 2 in Form seiner Genkarte charakterisiert. Alle H. saimiri SIRneoH Rekombinanten exprimieren das neo-Gen und sind in geeigneten Zellen, z.B. Sg 021, selektierbar, nachdem sie mit Virus aus den o.g. Kotransfektionen infiziert wurden. Sg 021-Zellen sind eine IL-2 abhängige T-Zelllinie aus Marmosets, die mit H. saimiri persistent infizierbar ist (R.C. Desrosiers et al., (1985) Mol. Cell. Biol. 5, 2796-2803). Die Gendosis des neo-Gens steigt dabei mit zunehmender G 418 Konzentration von etwa 40 bei 100 µg/ml G 418 auf etwa 140 bei 750 µg/ml G 418.

Durch Kokultivation mit OMK-Zellen wird wiederum rekombinantes "Neo-Virus" aus den Sg 021-Zellen erhalten.

Beispiel 3: Kotransfektion von pSneo DNA mit H. saimiri Virion DNA

Um die Ausbeute an Rekombinanten zu erhöhen, die das neo-Gen in die H/L-Verbindungsstelle inserieren, wurde im Prinzip wie in Beispiel 2

kotransfiziert, jedoch hier mit linearisierter pSneo DNA. Die aus dieser Transfektion resultierenden Viren H. saimiri SIRneoK hatten die neo-Sequenz innerhalb der pSneo DNA zwischen die L/H Übergangsstelle inseriert, wie in Fig. 3 gezeigt. Expression und Amplifikation des neo-Gens sowie Produktion von infektiösem rekombinantem Virus erfolgte wie in Beispiel 2 beschrieben.

Beispiel 4: Persistente Infektion humaner T-Zellen mit rekombinantem H. saimiri Virus

Mit H. saimiri SIRneoH14 wurde die permanent wachsende humane T-Zelllinie JURKAT (U. Schneider et al. (1977) Int. J. Cancer 19, 626; ATCC CRL 8163) infiziert und mit steigenden Konzentrationen Geneticin in RPMI 1640 Medium enthaltend 10% fötales Kälberserum kultiviert. Das neo-Gen war in den persistent infizierten JURKAT-Zellen in einer Gendosis von etwa 100 pro Zelle enthalten, was der Anzahl der H. saimiri SIRneoH14 Genome pro Zelle entspricht. Die virale DNA ist nicht in das zelluläre Genom integriert, sondern liegt als episomale DNA vor. Es waren in etwa 100 Kopien des rekombinanten Virus pro Zelle vorhanden.

Legende zu Figur 1:

- 1 bezeichnet das Plasmid PSV2 neo
- 2 bezeichnet das Plasmid PSV2 neo CS
- 3 bezeichnet das Plasmid pWD 11
- 4 bezeichnet das Plasmid pFG 24
- C steht für ClaI; E für EcoRI; K für KpnI
- S steht für Sall; Sm für Smal
- T steht für TaqI.

Die schraffierten Regionen bezeichnen den H. saimiri DNA-Anteil (terminales KpnI-SmaI Fragment der L-DNA), schwarze Dreiecke die H-DNA "Repeat"-Einheiten.

Legende zu Figur 2:

Der rechte H-/L-DNA Übergang von SIR-NEOH 14 ist dargestellt.

H steht für HindIII; K für KpnI; S für Sma I; Sa für Sall; A für die Spaltstelle der viralen Konkatemere. Die Zahlen bedeuten die Länge der DNA in kb.

Legende zu Figur 3:

siehe Figur 2

Ansprüche

1. H. saimiri Vektoren, dadurch gekennzeichnet, daß ein oder mehrere Fremdgene in der rechten oder linken Verbindungsregion der L- und H-DNA insertiert ist. 5
 2. H. saimiri Vektoren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß ein Selektionsgen in der rechten oder linken Verbindungsregion der L- und H-DNA insertiert ist. 10
 3. Vektoren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß das neo-Gen insertiert ist.
 4. Vektoren nach Anspruch 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß nicht-onkogene H. saimiri-Varianten gewählt werden. 15
 5. Verfahren zur Herstellung der Vektoren nach Anspruch 1, 2, 3 oder 4, dadurch gekennzeichnet, daß ein Selektionsgen und/oder ein oder mehrere Fremdgene in die rechte oder linke Verbindungsregion der L- und H-DNA einligiert wird. 20
 6. Verfahren zur Herstellung der Vektoren nach Anspruch 1, 2, 3 oder 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Ligation über Rekombination erfolgt.
 7. Verwendung der Vektoren nach Anspruch 1, 2, 3 oder 4 zur Expression von Fremdgenen in humanen T-Zellen. 25
 8. Verwendung der Vektoren nach Anspruch 1, 2, 3 oder 4 zur Expression von Fremdgenen in durch diese transformierten Affen-T-Lymphozyten.
 9. Verfahren zur Expression von Fremdgenen in humanen oder Affen-T-Zellen, dadurch gekennzeichnet, daß solche Zellen durch Vektoren nach Anspruch 1, 2, 3 oder 4 transformiert werden. 30
- ~~Reparaturprüfungen über Erfolgsraten~~
1. Verfahren zur Herstellung von H. saimiri Vektoren, dadurch gekennzeichnet, daß ein oder mehrere Fremdgene in die rechte oder linke Verbindungsregion der L- und H-DNA einligiert werden. 35
 2. Verfahren zur Herstellung von H. saimiri Vektoren, dadurch gekennzeichnet, daß ein Selektionsgen und/oder ein oder mehrere Fremdgene in die rechte oder linke Verbindungsregion der L- und H-DNA einligiert werden. 40
 3. Verfahren nach Anspruch 1 oder Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß als Selektionsgen das neo-Gen einligiert wird. 45
 4. Verfahren zur Herstellung von H. saimiri Vektoren nach Anspruch 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Ligation über Rekombinanten erfolgt. 50
 5. Verfahren zur Expression von Fremdgenen in humanen oder Affen-T-Zellen, dadurch gekennzeichnet, daß solche Zellen mit nach Anspruch 1, 2, 3 oder 4 hergestellten Vektoren transformiert werden. 55

FIG. 1

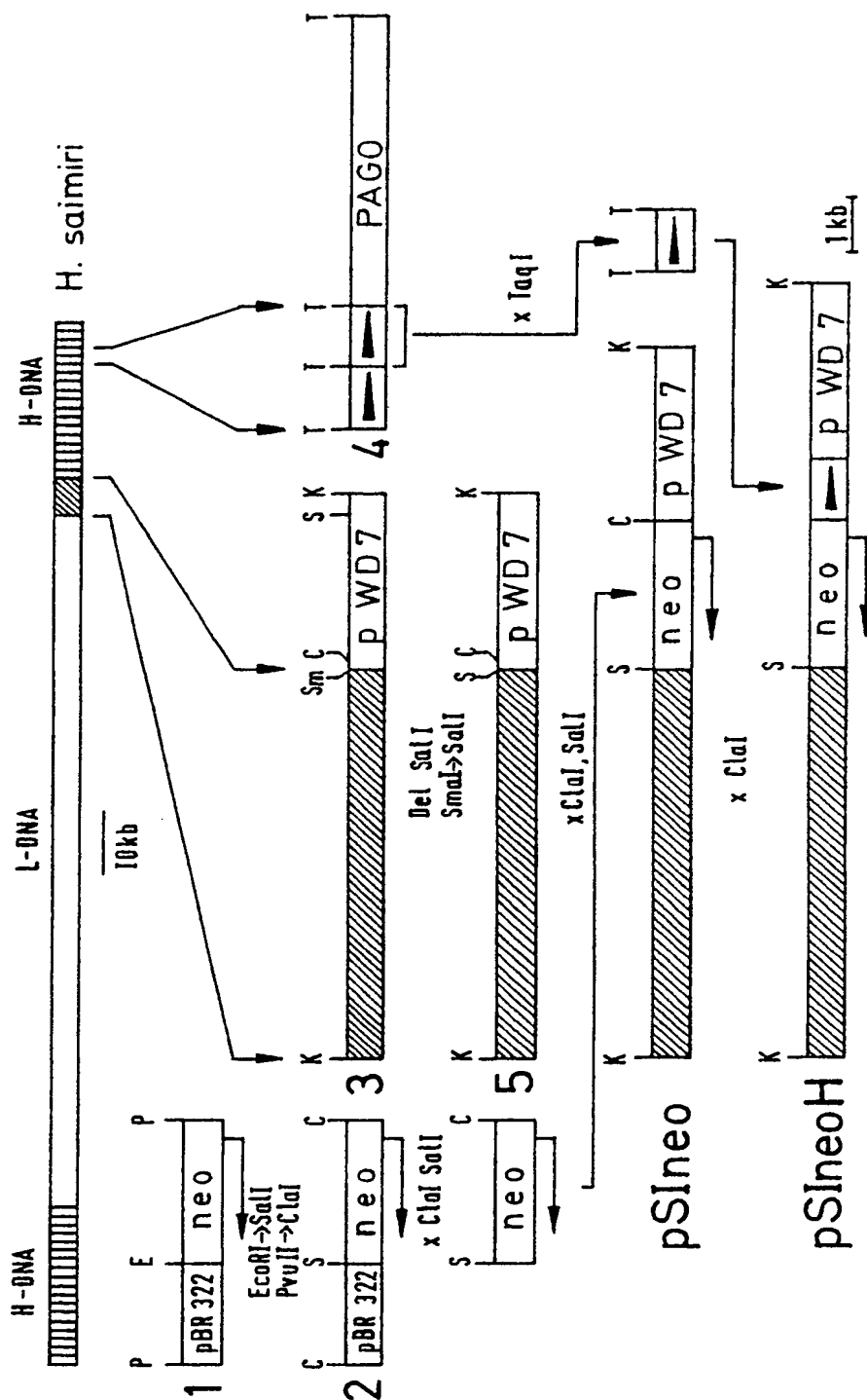


FIG. 2

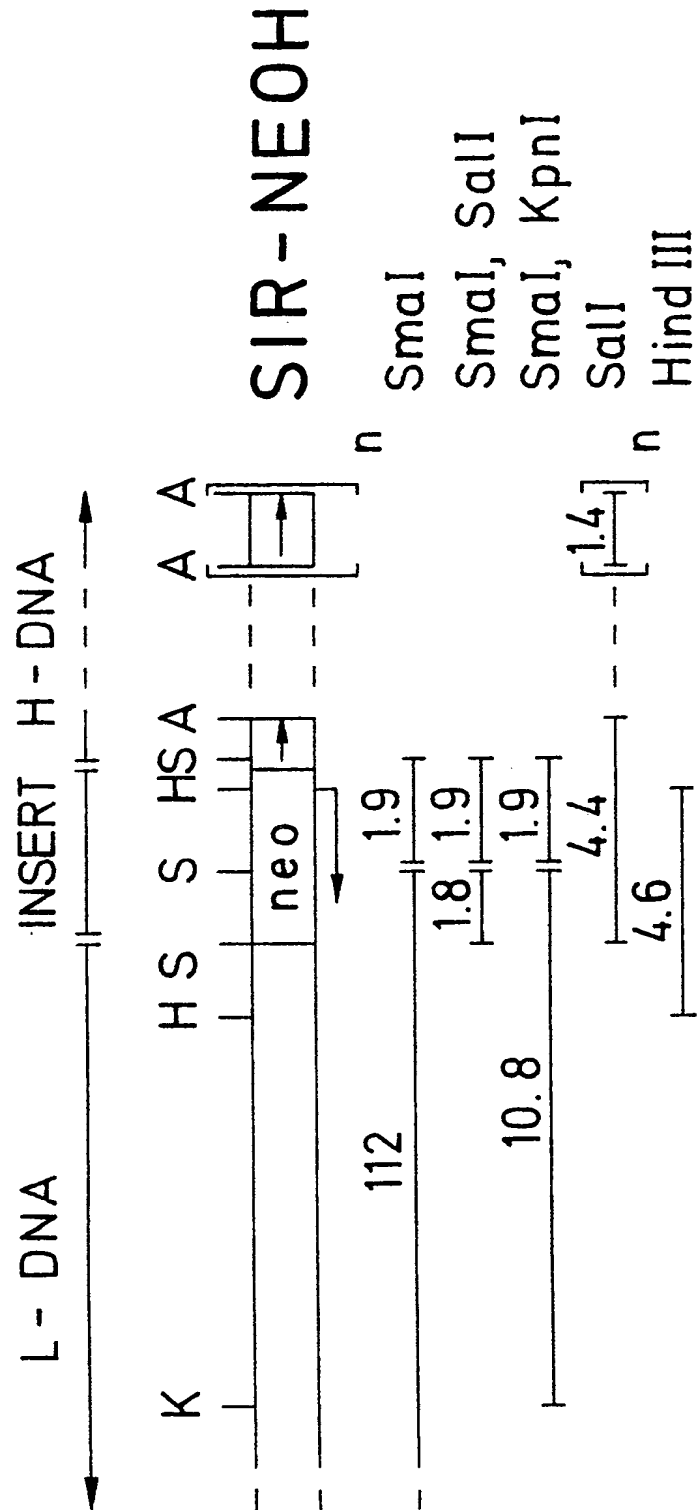
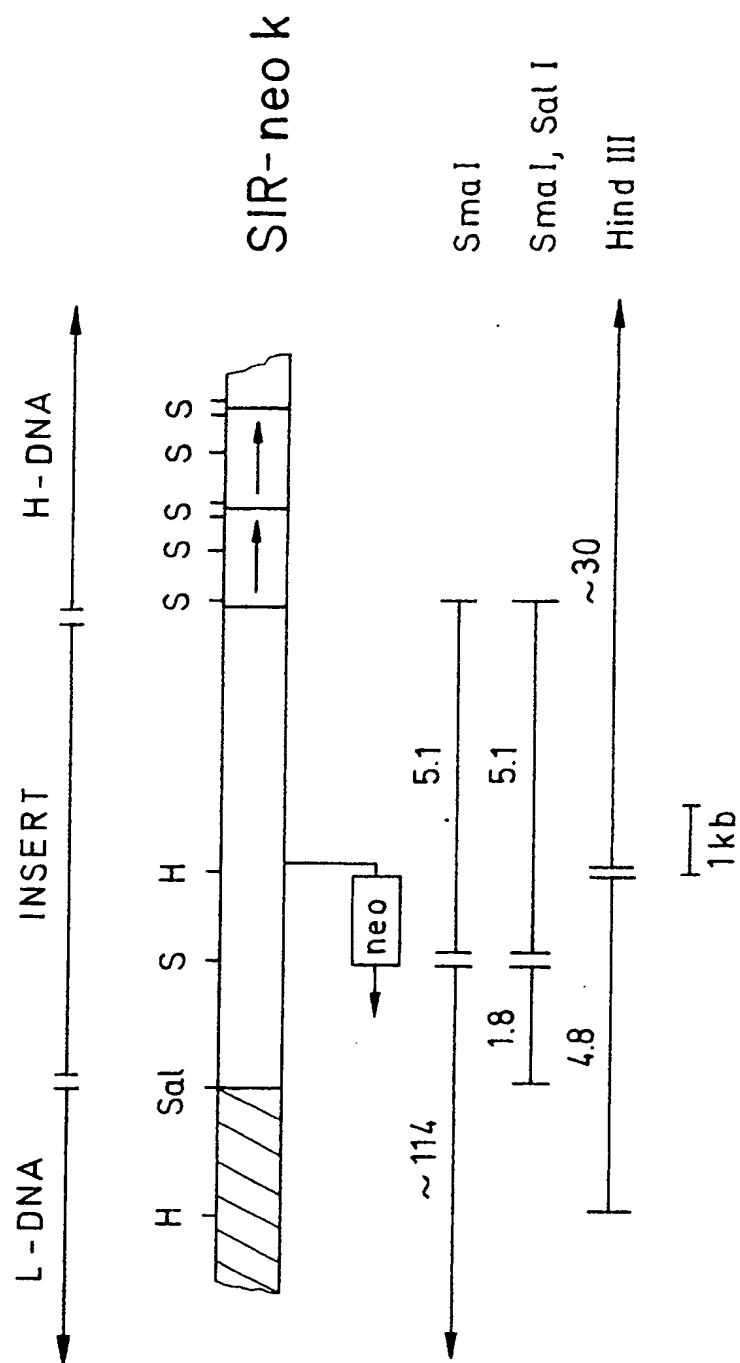


FIG. 3





Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



Veröffentlichungsnummer: **0 362 732 A3**

12

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

21 Anmeldenummer: 89118145.5

51 Int. Cl.⁵: **C12N 15/86**

22 Anmeldetag: 30.09.89

30 Priorität: 07.10.88 DE 3834157

43 Veröffentlichungstag der Anmeldung:
11.04.90 Patentblatt 90/15

84 Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE ES FR GB GR IT LI LU NL SE

88 Veröffentlichungstag des später veröffentlichten
Recherchenberichts: 14.08.91 Patentblatt 91/33

71 Anmelder: **BEHRINGWERKE**
Aktiengesellschaft
Postfach 1140
W-3550 Marburg 1(DE)

72 Erfinder: **Fleckenstein, Bernhard, Prof. Dr.**
Schlaifhausen 93
W-8551 Wiesenthau(DE)
Erfinder: **Grassmann, Ralph**
Rennesstrasse 26
W-8520 Erlangen(DE)

74 Vertreter: **Klein, Otto, Dr. et al**
Hoechst AG Zentrale Patentabteilung
Postfach 80 03 20
W-6230 Frankfurt am Main 80(DE)

54 **Selektierbare Vektoren für humane T-Zellen.**

57 Selektierbare Herpesvirus saimiri Vektoren werden beschrieben, die ein Selektionsgen in einer Verbindungsregion der L- und H-DNA inseriert haben. Solche Vektoren sind in der Lage, humane T-Zellen persistent zu infizieren und damit zur Expression von Fremdgenen in humanen T-Zellen geeignet. Ein zusätzlicher Vorteil besteht darin, daß dabei keine infektiösen Viruspartikel produziert werden.

EP 0 362 732 A3



European Patent
Office

EUROPEAN SEARCH REPORT

Application Number

EP 89 11 8145

DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			
Category	Citation of document with indication, where appropriate, of relevant passages	Relevant to claim	CLASSIFICATION OF THE APPLICATION (Int. Cl.5)
P,X	JOURNAL OF VIROLOGY vol. 63, no. 4, January 1990, pages 1818 - 1821; GRASSMANN & FLECKENSTEIN: "Selectable recombinant Herpesvirus Saimiri is capable of persisting in a human T-cell line" * the whole document *	1-9	C12N15/86
P,X	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA. vol. 86, May 1989, WASHINGTON US pages 3351 - 3355; GRASSMANN, R. et al.: "Transformation to continuous growth of primary human T lymphocytes by human T-cell Leukemia virus type I X-region genes transduced by a herp esvirus saimiri vector" * the whole document *	1-9	
E	WO-A-9004020 (DANA FARBER CANCER INSTITUTE) * the whole document *	1-9	
			TECHNICAL FIELDS SEARCHED (Int. Cl.5)
			C12N
The present search report has been drawn up for all claims			
Place of search THE HAGUE		Date of completion of the search 19 JUNE 1991	Examiner CHAMBONNET F.J.
CATEGORY OF CITED DOCUMENTS X : particularly relevant if taken alone Y : particularly relevant if combined with another document of the same category A : technological background O : non-written disclosure P : intermediate document T : theory or principle underlying the invention E : earlier patent document, but published on, or after the filing date D : document cited in the application I : document cited for other reasons & : member of the same patent family, corresponding document			

10

ECLF2
02F72
cpln
Cyden

EDFP1
ECLF1
= ORF 73

This is
our
remote
workspace
Backwards

ECRF3
Ghotern
Ula

363 → Eff Page

VOL 355 · 23 JANUARY 1992



accumulate during successive cell divisions as the result of rapid proteolytic degradation of the proteins at specific times before mitotic division, and different cyclin subtypes have distinct kinetics of accumulation^{16-18,20}.

The characterized cyclins, types A, B, C and D, are fairly well conserved both between themselves and between species (see for example, Table 1b), although different cyclins show greater divergence in amino-acid sequence towards their N termini, and the lengths of these less-conserved regions vary somewhat. Notably, the HVS *ECLF2* translation product lacks this N-terminal region, and thus is comparable in length to the D-type cyclins, and displays much less similarity with the cellular cyclins over analogous regions of these proteins than exists between the cellular cyclins. However, as shown in the alignments between the *ECLF2* translation products and human cyclin D, *Drosophila* cyclin A, *Drosophila* cyclin B, and *Xenopus* cyclin A (Fig. 3), the *ECLF2* gene is clearly homologous to the cyclins. The similarities between these proteins (and clam cyclin A) can be seen from the values shown in Table 1b.

The presence of homologues of the GCR and cyclin families

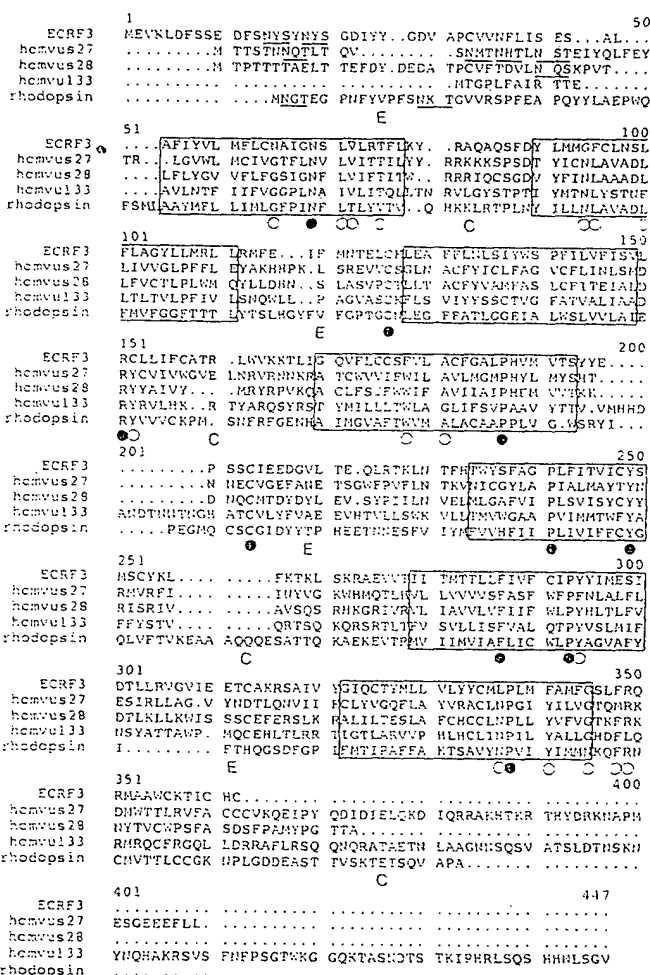


FIG. 2 Alignment of the *ECRF3* translation product with each of the three HCMV GCR homologues, US27, US28 and UL33 (ref. 9), and bovine rhodopsin (rhodopsin)³². The alignments were based on those performed by Chee *et al.*⁹ and on pairwise alignments using GAP³³, and were aligned manually by using the LINEUP and PRETTY programs in GCG¹¹. The boxed regions indicate putative transmembrane domains and expected extracellular (E) and cytoplasmic (C) domains are labelled. Potential N-linked glycosylation sites occurring in the N-terminal regions of the proteins are underlined. Amino acids conserved in all five proteins; O, those conserved in all but one of the sequences.

of cellular proteins in HVS, an oncogenic herpesvirus, the rapid proliferation of latently infected T cells in susceptible New World primates¹, is potentially of great significance. One of these sets of proteins are known to be involved in the regulation of cellular proliferation, differentiation and gene expression. Although the transforming potential of HVS correlates with the presence of an intact open reading frame encoding the so-called saimiri transformation-associated protein (STP)², this gene has not been shown to be sufficient for transformation and it is possible, therefore, that other viral genes may also be involved in transformation and/or accelerated T-cell proliferation.

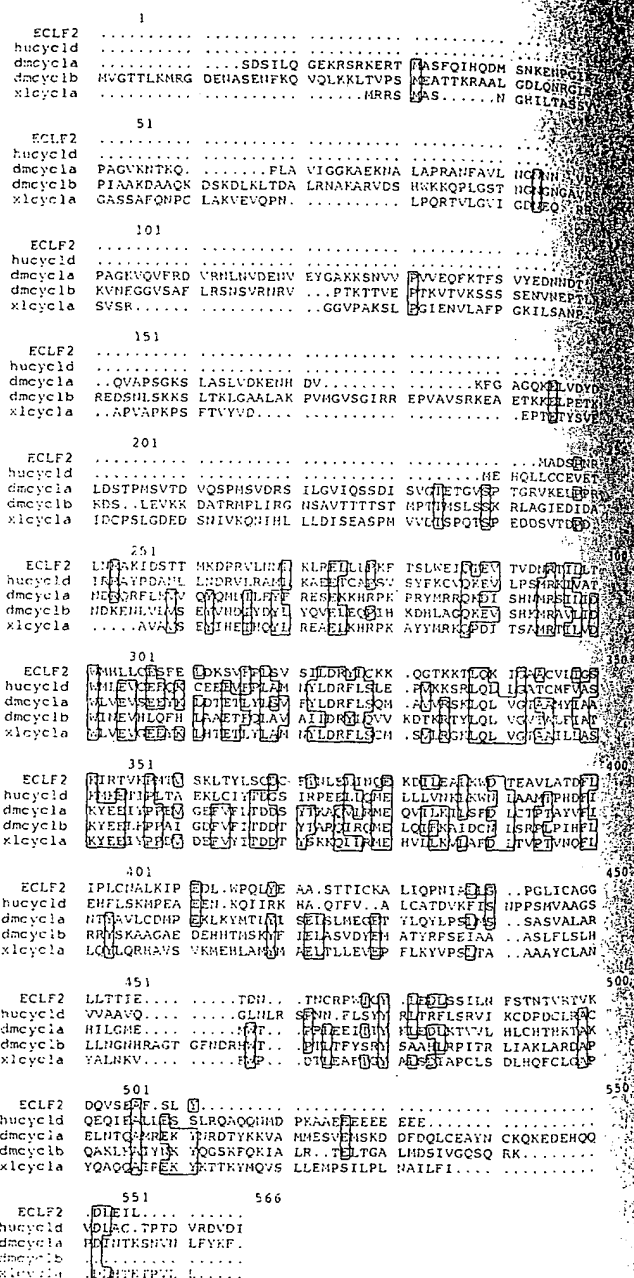


FIG. 3 Alignment of the *ECLF2* translation product with human cyclin D1 (hucyclid)¹⁸, *Drosophila* cyclins A (dmcycla)³⁴ and B (dmcyclb)³⁵ and *Xenopus* cyclin A (xlcycla)²⁰. The alignments of the five proteins are based on the outputs from pairwise alignments³³ and were assembled using the LINEUP and PRETTY options in GCG¹¹. Amino-acid residues conserved in at least three of the five proteins are boxed.



Specific members of the GCR protein family have a role in malignant transformation. For example, the ectopic expression of serotonin receptor (5HT1c) in NIH3T3 cells leads to serotonin-dependent transformation of these cells which can give rise to tumours in nude mice²³, and the human *mas* oncogene, which encodes an angiotensin receptor, is also tumorigenic in nude mice^{24,25}. Cyclins are required for cellular division, and thus have a key role in cellular proliferation and development¹⁶. Moreover, one of the cyclins, human D1 (ref. 19), is the *PRAD1* candidate oncogene implicated in the development of certain parathyroid tumours and hepatocarcinomas^{26,27}, and it is the D-type cyclins to which the HVS

ECLF2 protein seems to be most closely related. Cyclin A can associate with the cellular transcription factor E2F (refs 28, 29) which is likely to be directly involved in the regulation of expression of genes important for cellular proliferation and development, for example *c-myc*, *c-myb* and the EGF receptor gene³⁰. It is possible that the HVS cyclin may also associate with cellular transcription factors and thereby influence the expression of cellular and viral genes. Thus, the presence of cyclin and GCR homologues, *ECLF2* protein and *ECRF3* protein, in HVS may be highly relevant to the process of cellular transformation and rapid T-cell proliferation effected by HVS during latent infections of T cells in susceptible hosts. □

Received 16 September; accepted 22 October 1991.

1. Fleckenstein, B. & Desrosiers, R. C. In *The Herpesviruses* Vol. 1, 253-332 (ed. Roizman, B.) (Plenum, New York, 1982).
2. Cameron, K. R. et al. *J. Virol.* **61**, 2063-2070 (1987).
3. Gompels, U. A., Craxton, M. A. & Honess, R. W. *J. Virol.* **62**, 757-767 (1988).
4. Nicholas, J., Coles, L. S., Newman, C. & Honess, R. W. *J. Virol.* **65**, 2457-2466 (1991).
5. Honess, R. W. et al. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.* **83**, 3604-3608 (1986).
6. Trimble, J. J., Murthy, S. C. S., Bakker, A., Grassman, R. & Desrosiers, R. C. *Science* **239**, 1145-1147 (1988).
7. Murthy, S. C. S., Trimble, J. J. & Desrosiers, R. C. *J. Virol.* **63**, 3307-3314 (1989).
8. Nicholas, J., Smith, E. P., Coles, L. & Honess, R. *Virology* **179**, 189-200 (1990).
9. Chee, M. S., Satchwell, S. C., Preddie, E., Weston, K. M. & Barrell, B. G. *Nature* **344**, 774-777 (1990).
10. Kozak, M. *Nucleic Acids Res.* **9**, 5233-5252 (1981).
11. Devereux, J., Haeblerli, P. & Smithies, O. *Nucleic Acids Res.* **12**, 387-395 (1984).
12. Nathans, J. A. *Rev. Neurosci.* **10**, 163-194 (1987).
13. O'Dowd, B. F., Lefkowitz, R. J. & Caron, M. G. A. *Rev. Neurosci.* **12**, 67-83 (1989).
14. Friesler, S. J. & Basinger, S. F. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.* **82**, 1116-1120 (1985).
15. Karnik, S. S., Sakmar, T. P., Chen, H.-B. & Khorana, H. G. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.* **85**, 8459-8463 (1988).
16. Murray, A. W. & Kirschner, M. W. *Science* **246**, 614-621 (1989).
17. Wittenberg, C., Sugimoto, K. & Reed, S. I. *Cell* **62**, 225-237 (1990).
18. Matsushime, H., Roussel, M. F., Ashmun, R. A. & Sherr, C. J. *Cell* **65**, 701-713 (1991).

S-phase feedback control in budding yeast independent of tyrosine phosphorylation of p34^{cdc28}

Peter K. Sorger* & Andrew W. Murray†

*Department of Microbiology and Immunology and †Department of Biology, University of California, San Francisco, California 94143-0502, USA

In eukaryotic cells, entry into mitosis depends on the completion of DNA synthesis. This dependency is established by S-phase feedback controls that arrest cell division when damaged or unreplicated DNA is present¹. In the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, mutations that interfere with the phosphorylation of tyrosine 15 (Y15) of p34^{cdc2}, the protein kinase subunit of maturation-promoting factor, accelerate the entry into mitosis and abolish the ability of unreplicated DNA to arrest cells in G2 (ref. 2). Because the tyrosine phosphorylation of p34^{cdc2} is conserved in *S. pombe*³, *Xenopus*⁴, chicken⁵ and human⁶ cells, the regulation of p34^{cdc2}-Y15 phosphorylation could be a universal mechanism controlling the S-phase feedback control and regulating the initiation of mitosis^{7,8}. We have investigated these phenomena in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. We report here that the *cdc28* gene product (the *S. cerevisiae* homologue of *cdc2*) is phosphorylated on the equivalent tyrosine (Y19) during S phase and that mutations that prevent tyrosine phosphorylation do not induce premature mitosis and do not abolish feedback controls. We therefore demonstrated a mechanism that does not involve the phosphorylation of p34 by which cells arrest their division in response to the presence of unreplicated or damaged DNA. We conclude that this mechanism may not involve the inactivation of catalytic activity.

We established that p34^{cdc28} in budding yeast and fission yeast are phosphorylated on homologous

tyrosine residues. We prepared extracts from *S. cerevisiae* cells arrested in S phase with hydroxyurea, precipitated p34, and analysed it by immunoblotting. When precipitates from cells carrying wild-type (wt) *CDC28* were immunoblotted with anti-phosphotyrosine antibodies, a band corresponding to relative molecular mass of 34,000 (*M*, 34K) was detected (Fig. 1b). In extracts from cells carrying a modified *CDC28* gene that encodes a fusion between p34^{cdc28} and a short epitope tag⁹ (Fig. 1a), the 34K band was replaced by a 38K band. To show the specificity of the immunoblotting and to localize the phosphorylated site, we constructed a mutant (*cdc28-F*) in which a phenylalanine was substituted for tyrosine 19 (Y19), the residue in p34^{cdc28} that is homologous to the phosphorylated tyrosine 15 of p34^{cdc2} in *S. pombe* (Fig. 1a)². When p34 was analysed in extracts from *S. cerevisiae* cells carrying *cdc28-F* in place of wt *CDC28*, no phosphotyrosine was detected (Fig. 1b, lane 2) even though p34 was precipitated efficiently in all cases (lanes 5-8). Thus, p34^{cdc28} seems to be phosphorylated on Y19 in cells arrested in S phase.

To determine the cell-cycle dependence of Y19 phosphorylation, we prepared extracts from wt cells arrested at Start with α -factor or arrested in mitosis with the antimicrotubule drug benomyl. No phosphotyrosine was detected on p34 isolated from G1- or M-phase cells (Fig. 1b lanes 10 and 12), suggesting that the tyrosine phosphorylation of p34^{cdc28}, like that of p34 in other organisms⁷, is restricted to the S and G2 phases of the cell cycle. This biochemical difference also indicates that drugs that inhibit S phase and M phase arrest budding yeast cells at different points in the cell cycle, although the arrest points cannot be distinguished morphologically.

We examined the phenotype of *cdc28-F*, and of another mutant, *cdc28-AF*, which has an additional substitution of threonine to alanine at position 18 (residues homologous to T18 and Y19 coordinately regulate p34^{cdc2} in vertebrate cells¹⁰). The doubling time, size, and cell cycle distribution (as assayed by fluorescence-activated cell sorting (FACS)) of *cdc28-F* and *cdc28-AF* strains were very similar to wild type, indicating that mitosis was not induced prematurely in the mutants (data not shown).



•

